

ELEKTROPRZĘDZONE MEMBRANY KOMPOZYTOWE STYMULUJĄ MINERALIZACJĘ W HODOWLACH KOMÓREK KOSTNYCH

IZABELLA RAJZER^{1*}, ELŻBIETA MENASZEK²

¹ ATH AKADEMIA TECHNICZNO-HUMANISTYCZNA W BIELSKU-BIAŁEJ, WYDZIAŁ NAUK O MATERIAŁACH I ŚRODOWISKU, INSTYTUT INŻYNIERII TEKSTYLÓW I MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH, UL. WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIAŁA

² UJ UNIwersYTET Jagielloński, COLLEGIUM MEDICUM, ZAKŁAD CYTOBIOLOGII, UL. MEDYCZNA 9, 30-068 KRAKÓW

* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

Streszczenie

Biodegradowalne nanowłókniste membrany poddano badaniom in vitro, pozwalającym na ocenę stopnia różnicowania się i mineralizacji komórek kostnych w obecności potencjalnych podłoży tkankowych. Przedstawione badania oceniają wpływ mikrostruktury i składu chemicznego wytworzonych podłoży na przyczepność, proliferację i morfologię osteoblastów (NHOst). Badania procesu mineralizacji i aktywności ALP pozwoliły na ocenę procesu różnicowania się komórek.

Słowa kluczowe: podłoża dla inżynierii tkankowej, elektroprzędzone membrany, mineralizacja, różnicowanie komórek

[Inżynieria Biomateriałów 113 (2012) 35-39]

Wprowadzenie

Od materiałów stosowanych na podłoża dla inżynierii tkankowej kości wymaga się, aby były bioaktywne, biodegradowalne, porowate, i aby stymulowały komórki kostne. Ponieważ komórki łatwo reagują na bodźce otaczającego je środowiska, a tym samym na właściwości wytworzonego podłoża, równie istotna dla inżynierii tkankowej jest analiza oddziaływań komórka-materiał [1].

Elektroprzędzenie jest techniką często wykorzystywaną do wytwarzania nanowłóknistych podłoży naśladujących naturalną matrycę zewnątrzkomórkową (ECM), jednakże średnia średnica porów w podłożach wytwarzanych tą metodą, dla potrzeb inżynierii tkankowej kości, jest niewystarczająca [2]. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że połączenie metody elektroprzędzenia z techniką wypłukiwania porotwórczych dodatków pozwala wytwarzać podłoża o pożądanym rozkładzie porów i odpowiedniej mikrostrukturze [3]. Polikaprolakton (PCL) jest polimerem często wykorzystywanym do produkcji podłoży dla inżynierii tkankowej ze względu na dłuższy czas jego resorpcji [4]. PCL po implantacji charakteryzuje się lepszymi właściwościami mechanicznymi niż inne bioresorbowalne polimery a czas jego degradacji jest dopasowany do czasu regeneracji tkanki kostnej [5]. Jednakże słaba hydrofilowość podłoży z PCL wpływa na gorszą adhezję, proliferację i różnicowanie się komórek. Ponadto podłoża z PCL nie wykazują właściwości bioaktywnych, dlatego często modyfikowane są bioaktywnymi dodatkami m.in. hydroksyapatytem. Elektroprzędzenie kompozytowych podłoży PCL/HAp może wpłynąć na polepszenie przyczepności i proliferacji oraz na szybsze różnicowanie się komórek.

COMPOSITE ELECTROSPUN MEMBRANES STIMULATE MINERALIZATION IN BONE CELL CULTURE

IZABELLA RAJZER^{1*}, ELŻBIETA MENASZEK²

¹ ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA, FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER SCIENCE, 2 WILLOWA ST., 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

² UJ JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY, 9 MEDYCZNA ST., 30-068 KRAKOW, POLAND

* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

Abstract

A biodegradable nanofibrous nonwoven membranes were analyzed in vitro as potential scaffolds for differentiation and mineralization of bone cells. In this study we investigate the effects of electrospun membranes microstructure and chemical composition on attachment, proliferation, and morphology of human NHOst osteoblasts. Mineralization process and ALP activity were studied to estimate the cells differentiation.

Keywords: scaffolds for tissue engineering, electrospun membranes, mineralization, cell differentiation

[Engineering of Biomaterials 113 (2012) 35-39]

Introduction

Scaffolds for bone tissue engineering are required to be bioactive, biodegradable, porous and to stimulate bone cells. Optimizing cell-material interactions is critical in tissue engineering because cells are known to sense and respond to the physical properties of their environment and those of tissue scaffolds [1]. Electrospinning technique has been widely used to fabricate nanofibrous scaffold that mimic native extracellular matrix (ECM), however the average pore size in scaffold obtained using electrospinning is insufficient [2]. It was found in our previous study that the combined use of two techniques namely electrospinning and porogen-leaching, could be beneficial to fabricate desired pore size and final structure of scaffolds by varying the salt particle size [3]. The advantage in using poly(ϵ -caprolactone) (PCL) scaffolds in bone tissue engineering deals with its desirable biostability [4]. PCL exhibits more prolonged mechanical strength than other bioresorbable polymeric materials and degrades at a rate compatible with the bone regeneration [5]. However poor hydrophilicity of PCL caused a reduction in the ability of cell adhesion, proliferation and differentiation. PCL does not show any intrinsic bioactivity, therefore hydroxyapatite is often incorporated into material substrates. Electrospinning of PCL along with nanoparticles of hydroxyapatite can improve the cell attachment kinetics.

The aim of this work was to investigate the effects of electrospun membranes microstructure and chemical composition on attachment, proliferation, and morphology of bone cells. Mineralization process and ALP activity were studied to estimate the cells differentiation.

Praca miała na celu zbadanie wpływu mikrostruktury i składu chemicznego elektroprowadzonych podłoży na przyczepność, proliferację i morfologię komórek kostnych. Badania procesu mineralizacji i aktywności ALP pozwoliły na ocenę procesu różnicowania komórek.

Materialy i metody

Membrany z polikaprolaktonu (PCL) oraz polikaprolaktonu modyfikowanego hydroksyapatytem (PCL/HAP) wytworzono metodą elektroprowadzenia. 2,5 g PCL rozpuszczono w 40 ml mieszaniny chloroform/methanol 1:1 w temperaturze 50°C. Kompozytowe membrany PCL/HAP wytwarzano dodając do roztworu 20% wag. hydroksyapatytu, roztwór mieszało przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego. Następnie roztwór umieszczano w strzykawce (10 ml) zakończonej igłą ze stali nierdzewnej o średnicy 0,7 mm, prędkość dozowania roztworu wynosiła 1,5 ml/h. Doprowadzone do igły napięcie wynosiło 30 kV. Kolektor (owinięty papierem do pieczenia) znajdował się w odległości 15 cm od kapilary. Częsteczki soli dozowano na kolektor w trakcie elektroprowadzenia. Następnie wytworzoną membranę płukano w wodzie destylowanej w celu usunięcia soli i wygenerowania porów o większej średnicy. PCL wykorzystany w badaniach zakupiono w Sigma-Aldrich (Mn= 70 000-90 000 g/mol). Chloroform i metanol zakupiony został w firmie POCH (Polska). Hydroksyapatyt wytworzono w AGH-UST (Kraków, Polska). Średnia wielkość cząsteczek HAP wynosiła 23 nm. Jako środek porotwórczy wykorzystano chlorek sodu (POCH, Polska; wielkość cząstek: 2,5-4,5 µm). W rezultacie otrzymano cztery rodzaje nanowłóknistych materiałów:

1. PCL (polikaprolakton 100%);
2. PCL/HAP (polikaprolakton modyfikowany hydroksyapatytem);
3. PCL/P (polikaprolakton o zwiększonej porowatości, próbka wytworzona metodą elektroprowadzenia połączoną z tradycyjną techniką wypłukiwania dodatków);
4. PCL/HAP/P (polikaprolakton modyfikowany hydroksyapatytem o zwiększonej porowatości, próbka wytworzona metodą elektroprowadzenia połączoną z tradycyjną techniką wypłukiwania dodatków);

Fizyko-chemiczne właściwości wytworzonych materiałów (takie jak: mikrostruktura, porowatość oraz właściwości mechaniczne) przedstawione zostały w poprzedniej pracy [3].

Badania *in vitro*

Interakcje biomateriał/komórka porównano w hodowli pierwotnej ludzkich osteoblastów NHOst (Lonza, Szwajcaria). Komórki hodowano w plastikowych butelkach (Nunc, Dania) o pojemności 75 ml w pożywce hodowlanej OGM BulletKit (Lonza, USA), składającej się z medium hodowlanego OGM, 10% surowicy cielęcej FBS oraz 5% roztworu antybiotyków: gentamycyny i amfoterycyny-B, w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Do badań użyto komórki z pasażu od 5-6. Zawiesinę komórek uzyskano przez dodanie 5% trypsyny z EDTA (Lonza, USA). Po przepłukaniu i odwirowaniu komórki doprowadzano do stężenia 2x10⁴ komórek/ml w medium różnicującym z dodatkiem czynników różnicujących OGM Differentiation SingleQuot Kit (Lonza, USA), po czym 1 ml zawiesiny komórek umieszczano w studzienkach 24-dółkowej płytki hodowlanej (Nunc, Dania), zawierających sterylne krążki badanych materiałów. Kontrolę pozytywną stanowił polistyren dna pustych dołków płytki hodowlanej (TCPS). Inkubację komórek NHOst w obecności krążków włókniny o modyfikowanym składzie prowadzono przez 3 i 7 dni oraz 7, 14 i 21 dni (test mineralizacji) w inkubatorze HeraCell (Heraeus, Thermo Scientific, Niemcy), w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Po upływie wyznaczonego czasu komórki rosnące na powierzchni próbek poddano testowi przylegania i żywotności.

Materials and Methods

Polycaprolactone (PCL) and polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HAP) membranes used in the work were formed using electrospinning. The manufacturing began with dissolving 2.5 g of PCL in 40 ml of 1:1 chloroform/methanol solvent mixture at 50°C. In order to obtain PCL/HAP membranes, PCL solution was mixed with 20 wt% of HAP using sonicator. The solutions were fed into 10 ml plastic syringe fitted with a stainless-steel blunt needle of 0.7 mm in diameter and an injection rate of 1.5 mL/h using an infusion pump. A high voltage of 30 kV was applied. The fibres were collected on a flat collector wrapped with a piece of baking paper sheet which was kept at a distance of 15 cm from the needle tip. In order to improve the pore size of electrospun nanofibrous scaffold, salt particles were incorporated within the poly(ε-caprolactone) nanofibrous matrix and then were leached out to generate some macropores. PCL used in the study was purchased from Sigma-Aldrich (Mn= 70 000-90 000 g/mol). Chloroform and methanol (POCH, Poland) were used as solvents. Hydroxyapatite was produced at the AGH-UST (Krakow, Poland). An average size of the HAP particles was 23 nm. Fine sodium chloride (POCH, Poland; particle size: 2.5-4.5 µm) was used as porogen. As a result four types of materials were obtained:

1. PCL (polycaprolactone 100%);
2. PCL/HAP (hydroxyapatite-modified polycaprolactone);
3. PCL/P (polycaprolactone with increased porosity; the sample was produced by electrospinning combined with the traditional technique of leaching additives);
4. PCL/HAP/P (hydroxyapatite-modified polycaprolactone; the sample was produced by electrospinning combined with the traditional technique of leaching additives);

Physico-chemical properties of obtained materials (such as microstructure, porosity and mechanical properties) were previously described [3].

Cell culture

Biomaterial/cell interactions were compared in primary cultures of human NHOst osteoblasts (Lonza, Switzerland). Cells were cultured in plastic bottles (Nunc, Denmark) in the culture medium OGM BulletKit (Lonza, USA), consisting of OGM culture medium, 10% calf serum FBS and 5% solution of antibiotics: gentamicin and amphotericin-B, in an atmosphere of 5% CO₂ and temperature 37°C. The tests were conducted on cells from passages 5-6. The cell suspension was obtained by addition of 5% trypsin with EDTA (Lonza, USA). After flushing and centrifugation, the cells were concentrated to 2 x 10⁴ cells/ml in OGM medium with addition of differentiating factors: OGM Differentiation SingleQuot Kit (Lonza, USA). Next, 1 ml of the cell suspension was placed in the wells of a 24-well culture plate (Nunc, Denmark), containing sterile discs of tested materials. The polystyrene bottom of empty culture plate wells (TCPS) constituted positive control. Incubation of NHOst cells in the presence of nonwovens discs lasted for 3 and 7 days and 7, 14 and 21 days (mineralization test) in a HeraCell incubator (Heraeus, Thermo Scientific, Germany), in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

After the specified time, cells growing on the surface of the samples were tested for adhesion and viability. Cell viability was determined using ViaLight Assay. Cell enzymic activity and mineralization were assessed by alkaline phosphatase (ALP) activity assay and by OsteoImage mineralization test (Lonza, USA), respectively. Cell morphology was evaluated in the optical fluorescence microscope (Olympus, Japan).

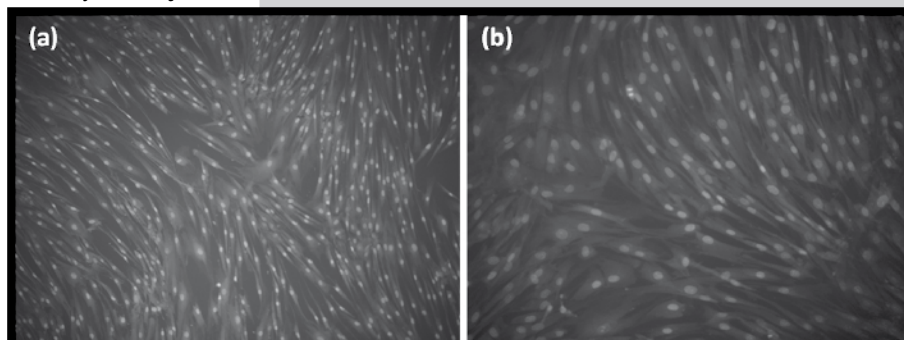
Żywotność komórek oznaczono testem ViaLight® (Lonza, USA). Enzymatyczną aktywność komórek oraz postęp mineralizacji oznaczono odpowiednio określając aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) oraz mierząc stężenie hydroksyapatytów testem OsteoImage (Lonza). Morfologię komórek oceniano w optycznym mikroskopie fluorescencyjnym (Olympus, Japonia).

Wyniki i dyskusja

Przyleganie komórek do powierzchni jest istotne dla licznych zjawisk, takich jak odpowiedź immunologiczna, gojenie i integracja tkanek z biomateriałami. Przyłgnięcie, adhezja i rozpostarcie komórek należą do pierwszej fazy interakcji, jakie zachodzą na styku komórka/biomateriał. Prawidłowy przebieg tych procesów wpływa na proliferację i różnicowanie się komórek na powierzchni biomateriałów. Obserwacja komórek pod mikroskopem (RYS. 1-2) wykazuje znaczną różnicę w morfologii komórek w porównaniu do kontroli. Niezależnie od rodzaju włókniny komórki przybierają kształt bardziej wydłużony, wrzecionowaty, mają dłuższe i cieńsze wypustki, tworzące sieć połączeń. Taki kształt komórek wymuszony jest przede wszystkim własnościami powierzchni włóknistego podłoża. Stosunkowo niska jakość zdjęć spowodowana jest wchłanianiem fluorescencyjnego barwnika przez włókniny i brakiem kontrastu między podłożem a komórkami. Na podkreślenie zasługuje fakt, że ze względu na porowatość powierzchni sieć połączonych wypustkami komórek ma strukturę trójwymiarową. Morfologia komórek rosnących na włókninach wskazuje na ich różnicowanie się. Za różnicowaniem komórek przemawiają również wartości testu OsteoImage, za pomocą którego oceniono postęp procesu mineralizacji w hodowli. Dla wszystkich materiałów modyfikowanych fosforanami wapnia obserwuje się istotny statystycznie przyrost wartości w porównaniu do kontroli, mimo mniejszej liczby komórek (RYS. 3). Zastanawiający jest spadek stężenia hydroksyapatytu w serii 14 dniowej w stosunku do 7-dniowej. Spowodowany jest on prawdopodobnie rozpuszczaniem wyjściowych hydroksyapatytów, będących składnikiem niektórych włóknin. O stopniu różnicowania komórek osteoblastycznych świadczy również, aktywność alkalicznej fosfatazy - enzymu będącego markerem wczesnego różnicowania się osteoblastów (RYS. 4). Struktura włóknin istotnie wpływa na żywotność komórek, zarówno w 3, jak i w 7 dniu hodowli (RYS. 5). Żywotność komórek na biomateriałach jest znacząco niższa w porównaniu do kontroli. Należy jednak podkreślić, że powierzchnia TCPS jest powierzchnią wyjątkowo sprzyjającą przyleganiu i intensywnej proliferacji komórek, natomiast nie wpływa ona na ich różnicowanie. Niższa proliferacja komórek na badanych włókninach niż na materiale kontrolnym, związana jest prawdopodobnie z szybszym różnicowaniem się komórek w obecności nanowłóknistych podłoży. Powszechnie wiadomo, że proliferacja komórek ulega zmniejszeniu kiedy rozpoczyna się proces ich różnicowania [6]. Wyniki badań in vitro wykazały dobrą przyczepność komórek do elektroprzędzonych materiałów, przy czym najlepszą przeżywalność komórek zaobserwowano w przypadku nanowłóknistych podłoży modyfikowanych hydroksyapatytem. Biologiczna ocena materiałów in vitro wykazała, że materiały modyfikowane hydroksyapatytem zapewniają wyższą aktywność ALP i lepszą mineralizację.

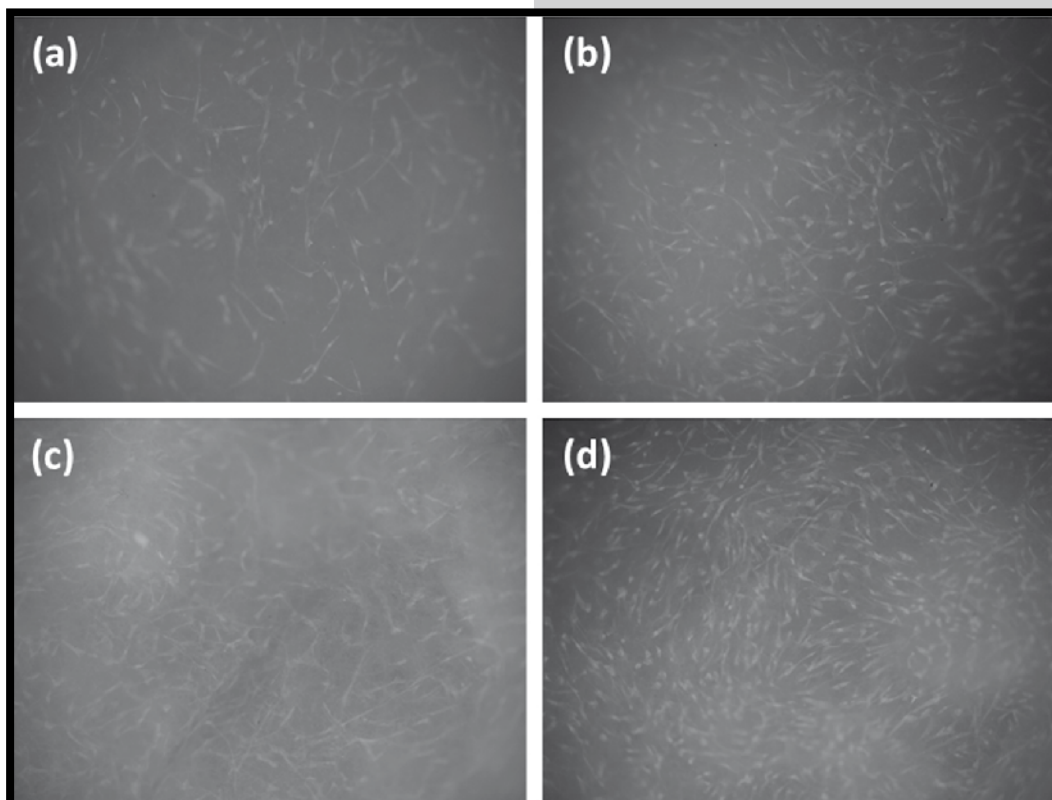
Results and Discussions

Cell adhesion to the surface is important for many phenomena, such as immune response, healing and tissue integration with biomaterials. Adherence, adhesion and spreading of cells belong to the first phase of the interactions that occur at the cell/biomaterial interface. These processes affect the proliferation and differentiation of cells on the surface of biomaterials. The microscopic observation of cells (FIG. 1-2), shows a significant difference in cell morphology compared to the control. Regardless of the type of nonwoven fabric, the cells assume a more elongated, spindle-like shape, have long and slender extensions. Such cell shape is primarily forced by surface properties of the fibrous scaffold. The relatively low quality of images obtained by fluorescent microscopy is caused by the absorption of the fluorescent dye by the nonwoven fabric and the lack of contrast between the scaffold and the cells. It is worth emphasising that, due to the porosity of the surface, the network of cells connected by cytoplasmic extensions has a three-dimensional structure. The shape of the cells growing on nonwoven fabric indicates probably the differentiation of the cells. Cell differentiation is also shown in the OsteoImage test values, through which the progress of mineralization is assessed. For all materials modified with calcium phosphates, statistically significant increase in values is observed as compared to the control, despite a smaller number of cells (FIG. 3). Striking is the decrease in the concentration of hydroxyapatite in the 14-day series compared to the 7-day series. It is probably due to dissolution of the initial hydroxyapatite, which is a component of some fabrics. The degree of cell differentiation is also shown by the activity of alkaline phosphatase - marker enzyme of osteoblast early differentiation (FIG. 4). Nonwoven fabric structure significantly affects cell viability, both on the 3rd and on the 7th day of the culture (FIG. 5). Results of viability tests of cells growing on biomaterials are significantly lower compared to the control. It should be noted, however, that the TCPS surface is a surface extremely favorable to adhesion and intense proliferation of cells, but it does not affect their differentiation. Electrospun samples evoked faster cell differentiation, therefore the cell proliferation on the control material was much higher than on investigated samples. It is known that cell proliferation decreases when cells reach confluence and initiate their differentiation process [6]. The results of in vitro studies showed that cells attached well to electrospun samples, and the highest cells viability was observed in the case of HAp modified nonwoven fabrics. In vitro biological evaluation showed that the presence of HAp particles offered higher activity of ALP and better mineralization.

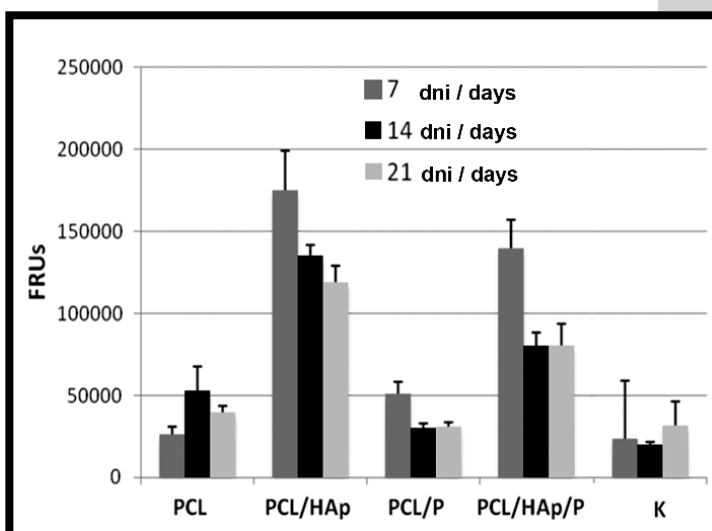


RYS. 1. Morfologia komórek NHOst hodowanych przez 7 dni na powierzchni kontrolnej TCPS (a) pow. obiektywu 10x, (b) pow. obiektywu 20x.

FIG. 1. Morphology of NHOst cell cultured for 7 days on the surface of on the TCPS control surface (a) org. magnification 10x, (b) org. magnification 20x.

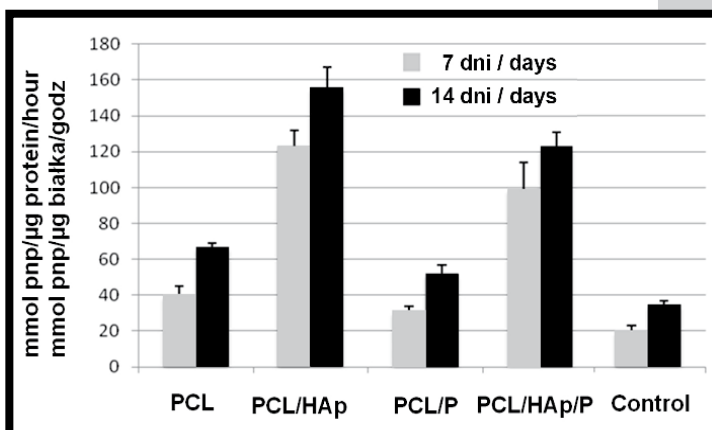


RYS. 2. Morfologia komórek NHOst hodowanych przez 7 dni na powierzchni elektropędzonych materiałów (pow. obiektywu 10x): (a) PCL, (b) PCL/HAp, (c) PCL/P, (d) PCL/HAp/P.
FIG. 2. Morphology of NHOst cell cultured for 7 days on the surface of electrospun materials (magnified 10x): (a) PCL, (b) PCL/HAp, (c) PCL/P, (d) PCL/HAp/P.



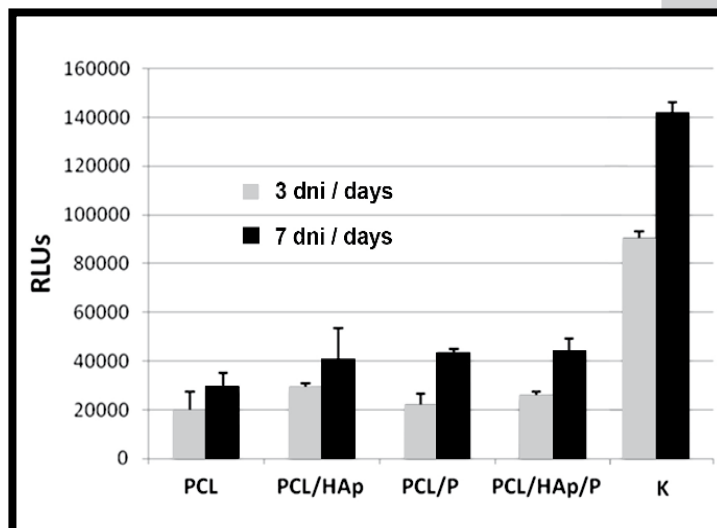
RYS. 3. Postęp mineralizacji mierzony stężeniem hydroksyapatytów w 7, 14 i 21 dniu hodowli komórek NHOst na powierzchni kontrolnej TCPS (K) oraz na powierzchni krążków włókniny. FRUs – względne jednostki fluorescencji. Różnice istotne statystycznie w stosunku do kontroli (wg testu T-Tukeya dla $p < 0.05$) wykazują materiały PCL/HAp oraz PCL/HAp/P.

FIG. 3. Mineralization progress measured by the concentration of hydroxyapatites on the 7th, 14th and 21st day of NHOst cell culture on the TCPS control surface (K) and on the surface of the nonwoven discs. RFUs – relative fluorescence units. Statistically significant differences compared to the control (according to the Tukey's t-test for $p < 0.05$) are exhibited by materials PCL/HAp and PCL/HAp/P.



RYS. 4. Aktywność fosfatazy alkalicznej w 7 i 14 dniu hodowli komórek NHOst na powierzchni kontrolnej TCPS (K) oraz na powierzchni krążków włókniny.

FIG. 4. Alkaline phosphatase activity on the 7th and 14th day of NHOst cell culture on the TCPS control surface (K) and on the surface of the nonwoven discs.



RYS. 5. Żywotność komórek NHOst oznaczona testem Vialight w 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni kontrolnej TCPS (K) oraz na powierzchniach krążków włókniny. Różnice istotne statystycznie między kontrolą a wszystkimi badanymi materiałami wg testu T-Tukeya dla $p < 0.05$. Rysunek przedstawia żywotność komórek w wartościach względnych luminescencji RLUs (Relative Luminescence Units).

FIG. 5. NHOst cell viability indicated using the Vialight test on the 3rd and 7th day of the culture on the TCPS control surface (K) and the surfaces of nonwoven fabric discs. Statistically significant differences between the control group and all the materials examined according to Tukey's t-test for $p < 0.05$. The figure shows cell viability in relative luminescence units (RLUs).

Wnioski

Naprawa ubytków kostnych wymaga biokompatybilnego podłoża umożliwiającego przyleganie, proliferację i różnicowanie się komórek tkanki kostnej. W badaniach biologicznych modyfikowanych włókien z polikaprolaktonu udowodniono, że stanowią one podłoże o własnościach korzystnych dla rekonstrukcji tkanki kostnej. Dzięki przestrzennej strukturze włókien, umożliwiającej dyfuzję składników odżywczych i gazów w głąb podłoża, hodowla osteoblastów tworzy trójwymiarową sieć połączonych wypustkami komórek. W porównaniu z dwuwymiarowym podłożem kontrolnym tempo proliferacji komórek jest słabsze, co jednak jest spowodowane głównie korzystnym efektem różnicowania się komórek. O różnicowaniu się komórek świadczy ich morfologia, aktywność enzymu - fosfatazy alkalicznej i wytwarzanie hydroksyapatytów, będących istotnym składnikiem substancji międzykomórkowej kości.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (projekt numer: N N507550938, 2010-2013) oraz ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Iuventus Plus IP2011044671).

Conclusions

Repair of bone loss requires a biocompatible surface allowing the adhesion, proliferation and differentiation of bone cells. In biological studies of modified PCL nonwoven fabrics it was proven that they are a substrate with advantageous properties for the reconstruction of bone tissue. Due to the spatial structure of fabrics, allowing diffusion of nutrients and gases into the substrate, osteoblast cultures create a three-dimensional network of cells. In comparison with the two-dimensional control substrate, the cell proliferation rate is lower, but this is mainly due to favourable effect of cell differentiation. The differentiation of cells is demonstrated in their morphology, activity of the enzyme - alkaline phosphatase, and the production of hydroxyapatites, which are an essential component of intercellular bone material matrix.

Acknowledgments

This work was supported by National Science Center (project number: N N507550938, 2010-2013) and by Polish Ministry of Science and Higher Education (project Iuventus Plus IP2011044671).

Piśmiennictwo

- [1] Chatterjee K., Lin-Gibson S., Wallace W.E., Parekh S.H., Lee Y.J., Cicerone M.T., Young M.F., Simon C.G.: The effect of 3D hydrogel scaffold modulus on osteoblast differentiation and mineralization revealed by combinatorial screening. *Biomaterials* 31 (2010) 5051-5062.
- [2] Rnjak-Kovacina J., Wise S.G., Li Z., Maitz P.H.M., Young C.J., Wang Y., Weiss A.S.: Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering. *Biomaterials* 32(28) (2011) 6729-6736.
- [3] Rajzer I.: Evaluation of PCL and PCL/HAp scaffolds processed by electrospinning and porogen leaching techniques. *Engineering of Biomaterials* 103 (2011) 4-7.

References

- [4] Sravanthi R.: Preparation and characterization of poly (ϵ -caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications. National Institute of Technology Rourkela (ORISSA). Thesis (2009).
- [5] Fabbri P., Bondioli F., Messori M., Bartoli C., Dinucci D., Chiellini F.: Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 343-351.
- [6] Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S.: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cell Physiology* 143 (1990) 420-30.